

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 37 04 389 A 1

21 Aktenzeichen: P 37 04 389.7
22 Anmeldetag: 12. 2. 87
43 Offenlegungstag: 25. 8. 88

51 Int. Cl. 4:
C 07 K 15/06

C 07 K 15/14
C 07 K 15/26
A 61 K 37/02
A 61 K 45/02
// (A61K 37/02,
45:05)C07D 493/22
(C07D 493/22,323:00)

DE 3704389 A 1

71 Anmelder:

Blutspendedienst der Landesverbände des
Deutschen Roten Kreuzes Niedersachsen,
Oldenburg und Bremen Gemeinnützige GmbH, 3257
Springe, DE

74 Vertreter:

Glawe, R., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Moll, W., Dipl.-Phys.
Dr.rer.nat., 8000 München; Delfs, K., Dipl.-Ing.;
Mengdehl, U., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Niebuhr, H.,
Dipl.-Phys. Dr.phil.habil., 2000 Hamburg; Glawe, U.,
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000 München

72 Erfinder:

Mohr, Harald, Dipl.-Chem. Dr., 3000 Hannover, DE

54 Verfahren zur Herstellung von Lymphokinen durch Induktion lymphoider Zellen

Lymphokine lassen sich durch Induktion lymphoider Zellen mit üblichen Stimulatoren herstellen, wenn man anstelle der als Tumorpromoter bekannten Costimulatoren PMA und Teleocidin das antineoplastisch wirkende Bryostatin einsetzt.

DE 3704389 A 1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Lymphokinen durch Induktion lymphoider Zellen mit einem Stimulator oder mehreren sowie einem Costimulator, dadurch gekennzeichnet, daß man Bryostatin als Costimulator verwendet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stimulator ein Calcium-Ionophor verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Calcium-Ionophor A 23 187 verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Calcium-Ionophor Ionomycin verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stimulator ein T-Zell-Mitogen verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stimulator ein Lectin verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stimulator Staphylokokkenenterotoxin A oder B verwendet.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Stimulator T-zellspezifische monoklonale Antikörper verwendet.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als lymphoide Zellen aus Spenderblut gewonnene Lymphocyten verwendet.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als lymphoide Zellen durch Cytopherese gewonnene Lymphocyten verwendet.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als lymphoide Zellen Lymphokine zernierende Zelllinien verwendet.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung der Lymphokine IL-2, IL-3, IFN- γ , Lymphotoxin, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, Eo-CSF, BCGF, BCDF, MIF und/oder MAF.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Lymphokinen durch Induktion lymphoider Zellen mit einem Stimulator oder mehreren sowie einem Costimulator.

Lymphoide Zellen wie weiße Blutzellen (Lymphocyten und Monocyten) erzeugen auf bestimmte Reize hin, z. B. nach Kontakt mit fremden Zellen, Viren, Antigenen oder Mitogenen, eine Vielzahl von Substanzen, die in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Diese Stoffe nennt man Lymphokine. Sie dienen der interzellulären Kommunikation innerhalb des Immunsystems. Sie wirken bereits in Konzentrationen von mg/ml.

Inzwischen sind über 100 verschiedene Lymphokine beschrieben worden. Es handelt sich dabei meist um Glykoproteine, deren Molekulargewichte etwa zwischen 10 000 bis 50 000 Da liegen.

Es besteht ein zunehmendes Interesse an Lymphokinen zur Therapie von Erkrankungen des Immunsystems und von Tumorerkrankungen. Die wichtigsten Lymphokine sind die folgenden:

IL-1 (Interleukin-1) ist ein Monocyten-Produkt, das die Proliferation von Thymocyten stimuliert. IL-1 ist vermutlich ein wichtiger Mediator bei chronischen Entzündungsprozessen; es wirkt als endogenes Pyrogen, stimuliert die Produktion von Kollagenase durch Fibroblasten und rheumatische Synovialzellen und stimuliert die Proliferation von Fibroblasten. Dies könnte die Fibrose verursachen, die häufig bei chronischen Entzündungen auftritt. (IL-1 wird nicht von aktivierten T-Lymphocyten synthetisiert; seine Herstellung gehört daher nicht zum Gegenstand der Erfindung).

IL-2 (Interleukin-2), dessen Synthese durch T-Zellen in vivo durch IL-1 reguliert wird, stimuliert die Proliferation von Lectin- oder Antigen-aktivierten T-Zellen, aber auch von B-Zellen. In vitro und in vivo lassen sich die aktivierten Zellen mit Hilfe von IL-2 expandieren. Die Cytotoxizität von T-Lymphocyten wird hierdurch stark erhöht. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, IL-2 bei der Therapie von Tumorerkrankungen einzusetzen. Erste klinische Studien werden gegenwärtig durchgeführt.

IFN-Gamma (γ -Interferon) wird durch T-Lymphocyten gebildet; die Produktion wird durch IL-2 reguliert. Die Substanz wird in ausgedehnten Studien klinisch erprobt.

Lymphotoxin (Tumor-Nekrosis-Faktor- β , TNF- β) wird zusammen mit IFN- γ von entsprechend induzierten T-Lymphocyten sezerniert. Es wirkt speziell auf Tumorzellen, und zwar cytolytisch oder cytostatisch. Die Zellen werden dadurch gegenüber dem cytolytischen Angriff durch natural-Killerzellen sensibilisiert. Dies macht Lymphotoxin als Therapeutikum bei Tumorerkrankungen interessant, u. U. in Kombination mit IFN.

IL-3 (Interleukin-3) ist ein weiterer Faktor, der von aktivierten T-Lymphocyten gebildet wird. IL-3 stimuliert das Wachstum von multipotenten hematopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und ist auch an der Erythropoese beteiligt. Weil es auf alle Arten von Vorläuferzellen wirkt, nennt man IL-3 auch multi colony stimulating factor.

CSF (Colony stimulating factors) wirken stärker spezifisch als IL-3 auf Vorläuferzellen. Zu ihnen gehören G-CSF, das die Bildung von Granulocyten stimuliert, M-CSF (stimuliert die Bildung von Monocyten) und GM-CSF (stimuliert die Bildung von Granulocyten und Monocyten).

Eo-CSF stimuliert die Neubildung von eosinophilen Granulocyten. Neben anderen Lymphokinen werden diese Faktoren auch von Lymphocytenklonen, d. h. propagierten T-Zellen, synthetisiert.

BCGF (B-Zellwachstumsfaktor; auch als BSF-1 [B-Zell-Stimulierungsfaktor] oder IL-4 bezeichnet) regt wie eventuell auch IL-2 B-Zellen zur Teilung und Vermehrung an.

BCDF (B-Zelldifferenzierungsfaktor; auch als BCGFII oder IL-5 bezeichnet) bringt B-Zellen zur Ig-Synthese.

Es lassen sich mindestens zwei Differenzierungsfaktoren unterscheiden, nämlich BCDF μ (induziert die Synthese von IgM) und BCDF- γ (induziert die Synthese von IgG).

MIF (Macrophage inhibiting factor) und MAF (Macrophage activating factor) erhöhen die Aktivität von Makrophagen u. a. gegenüber Tumorzellen und Parasiten. Es wird allerdings diskutiert, daß MAF und IFN- γ identisch sind.

An sämtlichen der vorgenannten Lymphokine besteht zumindest ein Bedarf zu Forschungszwecken. Abgesehen von den sich bereits in der klinischen Erprobung befindenden Lymphokinen IL-2 und IFN- γ besteht jedoch auch an den anderen Lymphokinen ein therapeutisches Interesse. So soll Lymphotoxin die Wirkung von Interferonen verstärken (und umgekehrt). MAF kann bei der Tumorthherapie und bei der Behandlung septischer Krankheiten eingesetzt werden. Für IL-3 und die CSF-Faktoren erscheint eine therapeutische Verwendung bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems möglich. Die B-Zellwachstums- und Differenzierungsfaktoren sind für die in-vitro-Synthese von humanen monospezifischen Immunglobulinen durch propagierte B-Lymphocyten von Bedeutung.

Es sind bereits verschiedene Verfahren bekannt, Lymphokine durch Induktion lymphoider Zellen mit Stimulatorens und Costimulatorens zu bilden und zu isolieren (vgl. WO 81/03489 und DE-OS 34 11 184). Als lymphoide Zellen können dabei humane Lymphocyten aus Spenderblut und durch Cytopherese gewonnene Lymphocyten eingesetzt werden, weiterhin transformierte Zelllinien, z. B. die Jurkat-Zelllinie (die IL-2 produziert) oder die KGI-Zelllinie (die IFN- γ produziert).

Als Stimulatoren werden dabei unter anderem die folgenden Substanzen eingesetzt:

Lectine wie ConA (Concavalin A) und PHA (Phytohämagglutinin), Staphylokokkenenterotoxin A und B (SEA, SEB), Calciumionophore, z. B. Ionophor A 23187 sowie Ionomycin, weiterhin Antilymphocytenserum und T-zell-spezifische monoklonale Antikörper.

Als Costimulatoren werden häufig PMA (4 β -Phorbol-12-myristat-13-acetat) und Teleocidin verwendet. Sie wirken für sich allein nur schwach mitogen, ihre Wirkung erhöht sich jedoch in Kombination mit anderen Mitogenen um ein Vielfaches. Diese Substanzen weisen jedoch den Nachteil auf, daß sie ausgeprägte Tumorpromoter sind. Es besteht daher ein Bedürfnis nach Costimulatoren mit weniger kritisch zu beurteilenden Eigenschaften.

Es wurde nun gefunden, daß man bei der Herstellung von Lymphokinen aus lymphoiden Zellen in Gegenwart der obengenannten Stimulatoren zu ebenso guten Ergebnissen kommt, wenn man anstelle der vorgenannten Costimulatoren Bryostatin einsetzt. Diese Erkenntnis ist überraschend, da Bryostatin eine antineoplastische Wirkung aufweist.

Mit "Bryostatin" bezeichnet man eine Gruppe von makrocyclischen Lactonen, die aus verschiedenen Meeresorganismen wie Bryozoa Butula neritina und Bryozoa phylum isoliert werden können, vgl. J. Am. Chem. Soc. 104, 6848 (1982); J. Nat. Prod. 46 (4), 528 (1983); J. Org. Chem. 48, 5354 (1983); J. Am. Chem. Soc. 106, 6768 (1984); Can. J. Chem. 63, 1204 (1985); Tetrahedron 41 (6), 985 (1985); J. Nat. Products 49 (4), 661 (1986). Es sind derzeit neun verschiedene natürliche Bryostatinderivate bekannt, von denen zu erwarten ist, daß sie erfindungsgemäß als Costimulatoren eingesetzt werden können. Untersucht wurden — und erfindungsgemäß bevorzugt sind — Bryostatin 1, 2 und 8; da die Ergebnisse in jedem Falle jedoch gleich waren, wird hier im wesentlichen nur über die mit Bryostatin 1 erhaltenen Ergebnisse berichtet.

Weitere vorteilhafte Merkmale der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Das Verfahren der Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, wobei auf die Zeichnungen Bezug genommen wird. Es zeigt

Fig. 1 die Strukturformel von Bryostatin 1,

Fig. 2a, b grafische Darstellungen der Verstärkung der IL-2- bzw. IFN- γ -Synthese durch Coinduktion von A 23 187-induzierten Lymphocyten mit Bryostatin 1, PMA oder Teleocidin,

Fig. 3a, b grafische Darstellungen der Kinetik der IL-2- und IFN- γ -Synthese durch A 23 187 (150 ng/ml)-induzierte Lymphocyten mit

Bryostatin (20 ng/ml) \times — \times oder
PMA (10 ng/ml) \square — \square

Fig. 4 eine fotografische Abbildung des Ergebnisses der SDS-Polyacrylamid-Gradient-(4 — 20%)-Gelelektrophorese von Proteinkonzentraten der überstehenden Flüssigkeit von Lymphocytenkulturen. Die Lymphocyten-suspensionen wurden induziert und bei 37°C 72 Stunden inkubiert. Die Lymphokin-enhaltenden Proteinfractionen wurden, wie weiter unten erläutert, konzentriert und der Elektrophorese unterworfen.

Bahn 1 und 8: Molekulargewichtsmarker;

Bahn 2: Konzentrat von nichtinduzierten Zellen;

Bahn 3 bis 7: Konzentrate von Zellen induziert mit PMA (3), Bryostatin (4), A 23 187 (5), PMA + A 23 187 (6), Bryostatin + A 23 187 (7).

Die Verfahrensdurchführung entspricht im wesentlichen derjenigen der DE-OS 34 11 184.

Beispiel 1

Aus bis zu 48 Stunden alten Blutkonserven wurden die Buffy Coats gewonnen und mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 2 verdünnt. Die lymphocytenreiche Zellfraktion wurde durch Zentrifugation über Ficoll-Paque der Firma Pharmacia Fine Chemicals GmbH, $d = 1076 \text{ g/cm}^3$, gewonnen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $5 \times 10^6/\text{cm}^3$ in dem Kulturmedium RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe), das als Zusätze Hepes

(25 mM) und Antibiotika (je 10 µg/ml Neomycin und Streptomycin) enthielt, suspendiert. Der Proteingehalt wurde mit humanem Plasmaprotein auf 0,5 bis 1 mg/ml eingestellt. Das Volumen der Zellkultur betrug im allgemeinen 20 ml in 100-ml-Erlenmeyerkolben.

Den Zellkulturen wurden Mitogene und PMA, Teleocidin bzw. Bryostatin 1, 2 und 8 (extrahiert aus Bryozoa Bugula neritina und phylum [Amathia convoluta]) zugesetzt. Die eingestellten Konzentrationen von Mitogenen, PMA und Bryostatin (Bryo) sowie die erhaltenen IL-2- und IFN- γ -Konzentrationen ergeben sich aus der Tabelle 1.

Tabelle 1

Vergleich des Einflusses von Bryostatin (20 ng/ml) und PMA (10 ng/ml) auf die durch verschiedene Mitogene induzierte IL-2 und IFN- γ -Synthese.

Mitogen	ng/ml	IL-2 U/ml	+ PMA		+ Bryo		+ PMA		+ Bryo	
A 23 187	0,15	15	1520		1510		800	8000	8000	
PHA-M	(4%)	< 10	800		1110		300	1600	1600	
SEA	0,02	< 10	160		100		800	1600	800	
ConA	25	< 10	280		370		200	2400	2400	
SEB	0,1	13	100		100		800	800	400	

Die Mitogen und Costimulator enthaltenden Zellsuspensionen wurden unter leichtem Schütteln bei 37°C 48 bis 72 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und der Zellkulturüberstand isoliert.

Beispiel 2

Spenderblut wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Dann wurde der Plasmaüberstand isoliert und die darin befindlichen Leukocyten durch Zentrifugation gewonnen. Die Zellen wurden, wie in Beispiel 1 angegeben, im Zellkulturmedium suspendiert, stimuliert und inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand isoliert. Es wurden die gleichen Ergebnisse wie in Beispiel 1 erhalten.

Die Bestimmung der IFN- γ -Konzentration erfolgte nach üblichen Methoden (J. Virol. 37, 755 [1981]). Die erhaltenen Titer wurden gegen den internationalen Standard für IFN- γ Gg 23-901-539 des National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) geeicht.

Die Bestimmung von IL-2 erfolgte über einen Lymphoblasten-Proliferationstest, der nach der Erfahrung der Anmelder den Vorteil hat, daß er nicht von PMA und anderen erfindungsgemäß einzusetzenden Substanzen beeinträchtigt wird. Für die Blastogenese wurden mononukleare Blutzellen aus Spenderblut bei einer Dichte von 7×10^5 /ml in RPMI 1640 + 5% menschliches Serum suspendiert und in Gegenwart von Concanavalin A (10 µg/ml) 4 bis 5 Tage bei 37°C in feuchter, 5% Kohlendioxid enthaltender Atmosphäre suspendiert. Die Blasten wurden auf 5×10^5 /ml mit dem gleichen Kulturmedium eingestellt. 100 µl Teile der Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen von Verdünnungen der IL-2 enthaltenden Proben gemischt und ca. weitere 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Leukocytenzähler der Firma TOA Medical Electronics (Tokyo) gezählt. Die erhaltenen Zählraten wurden mit denjenigen verglichen, die mit Verdünnungen der vorläufigen IL-2-Standardpräparation ISDP 841 der NIH erhalten wurden.

Die Konzentrierung der Lymphokine erfolgte analog zu dem in Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78 (3), 1601 (1981) beschriebenen Verfahren, mit der Ausnahme, daß anstelle von Glas mit einheitlichem Porenvolumen zur Extraktion der die Lymphokine enthaltenen Proteinfractionen aus den überstehenden Kulturflüssigkeiten poröses Silicagel mit einem mittleren Porendurchmesser von 100 Angström (Matrex Silicagel der Firma Amicon, Witten) verwendet wurde. 10 g Silicagel wurden zu 1 l der überstehenden Zellkulturflüssigkeit gegeben; die Suspension wurde ca. 30 Minuten gereinigt. Das Gel wurde isoliert, in eine Chromatografierkolonne gegeben und gründlich mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Gebundenes Material wurde mit Phosphatpuffer (10 mM) mit einem pH von 7,4 und einem Gehalt von 0,5 n NaCl und 50% Ethylenglykol, eluiert. In bezug auf die Zellkulturflüssigkeit betragen die Ausbeuten an IL-2 und IFN- γ nahe 100%.

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach einem üblichen Verfahren (Nature 227, 680 [1970]); die Proteinbanden wurden durch Anfärbung mit Silber sichtbar gemacht.

Obwohl die Ausführungsbeispiele lediglich die Isolierung von IL-2 und IFN- γ behandeln, ist die Erfindung nicht auf die Herstellung dieser Lymphokine beschränkt. Die übrigen, eingangs genannten Lymphokine sind in den erfindungsgemäß erhaltenen Zellkulturflüssigkeiten nach dem Fachmann geläufigen Methoden nachgewiesen worden; sie können nach ebenfalls üblichen Methoden isoliert werden.

3704389

Fig. 1:

Number:

Int. Cl.4:

Anmeldetag:

Offenlegungstag:

37 04 389

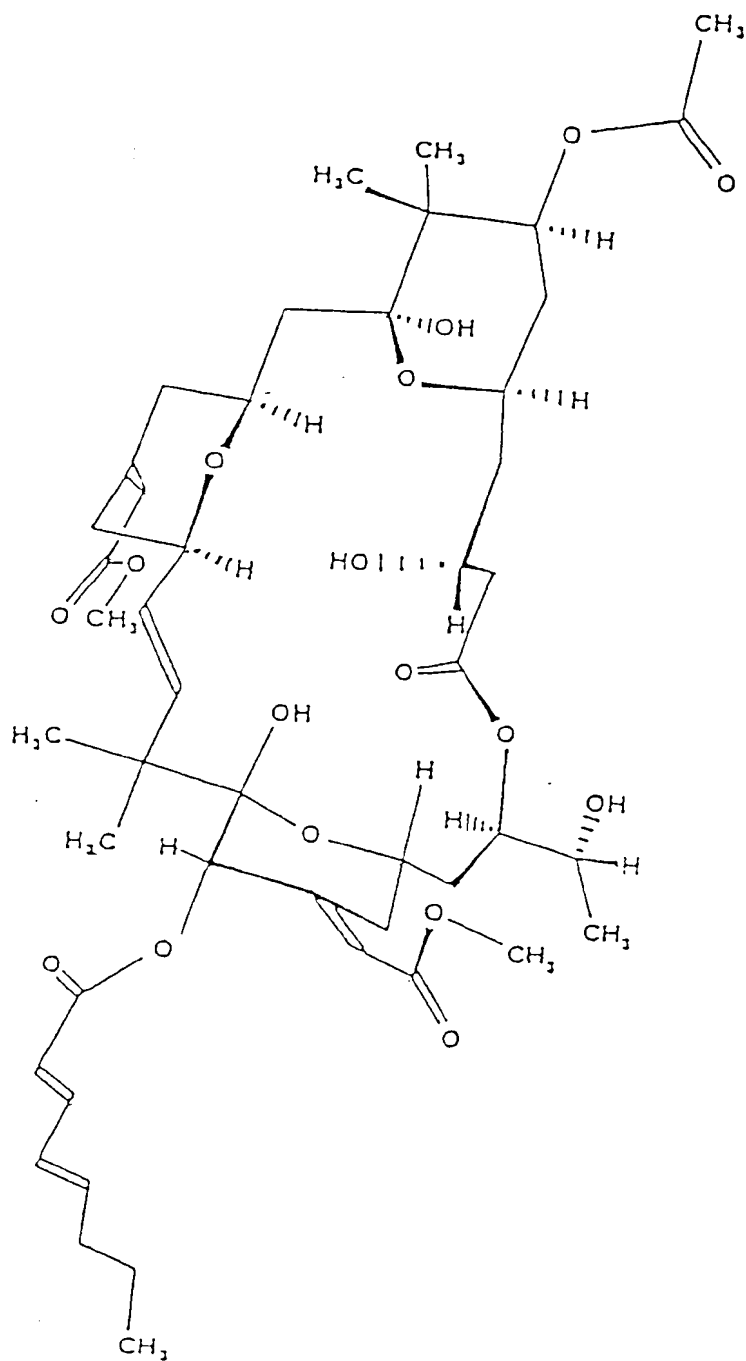
C 07 K 15/06

12. Februar 1987

25. August 1988

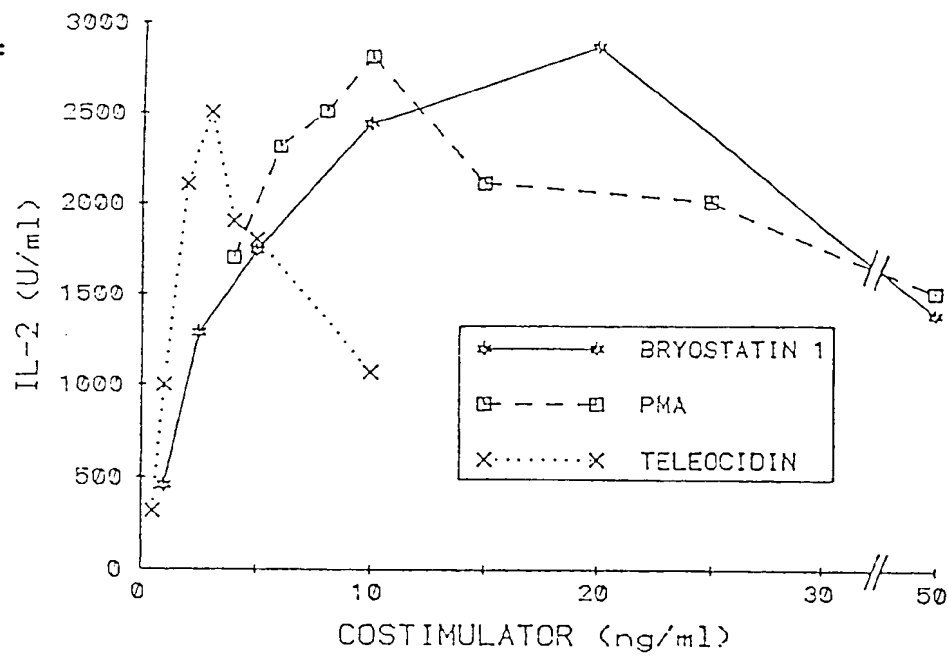
13 A

43



3704389

Fig. 2a:



2b:

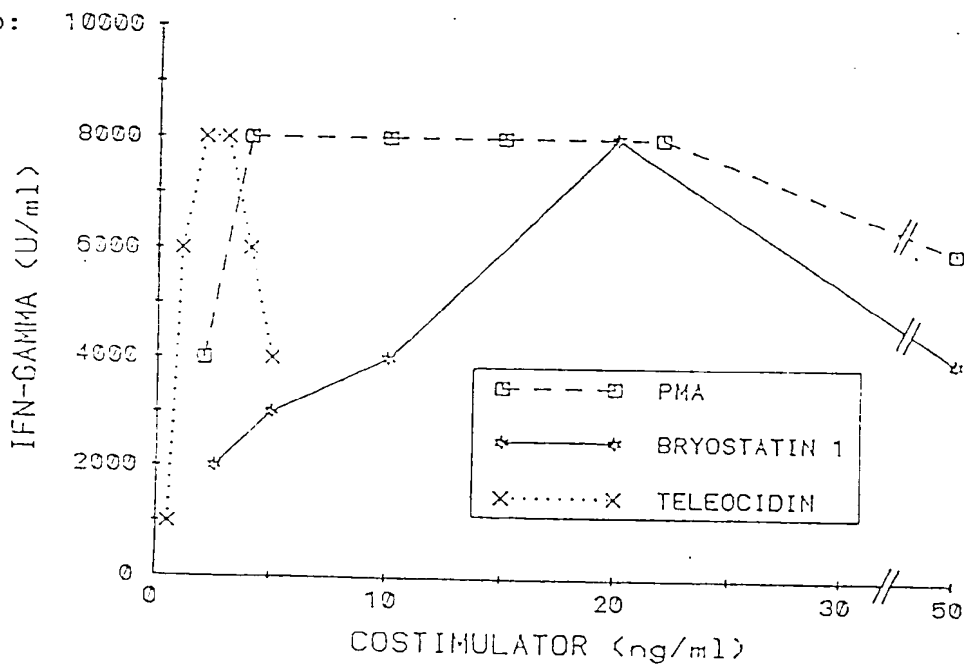
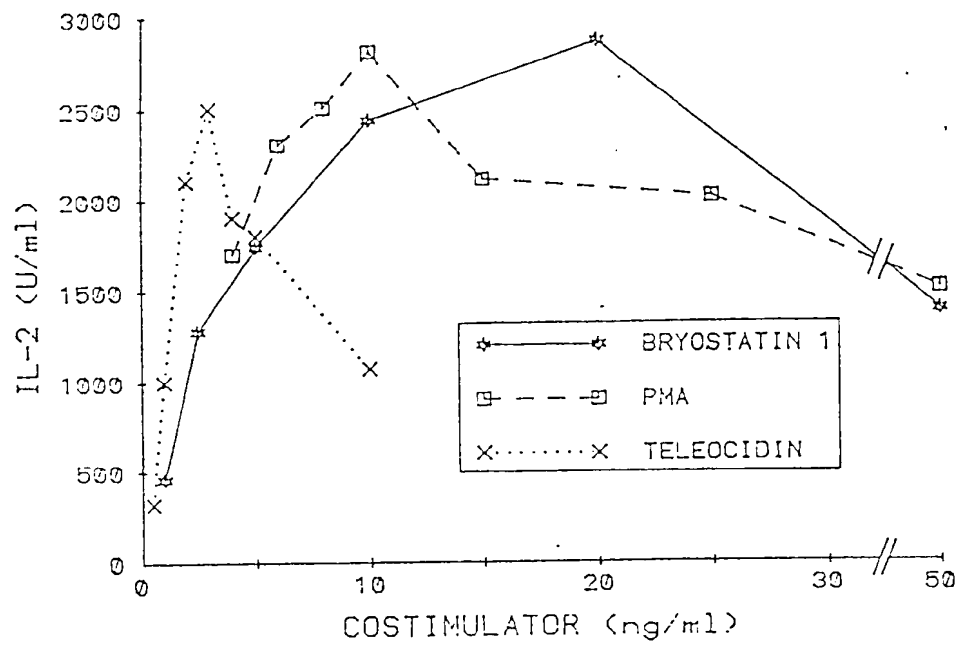


Fig. 3a:



3b:

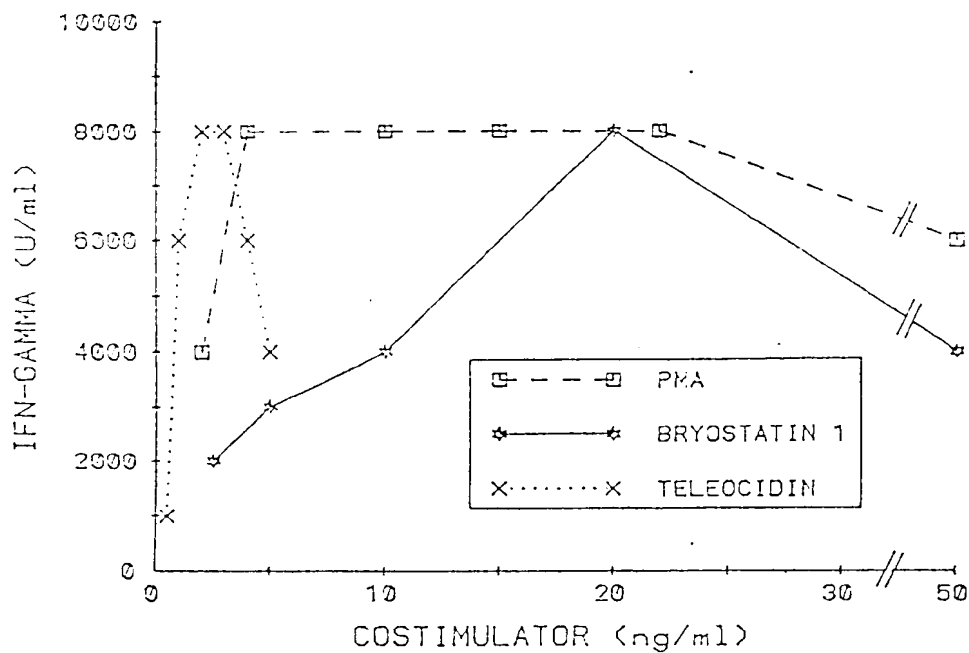


Fig. 4:

3704389

